

**Vergleichende histologisch-fluoreszenzoptische
Untersuchungen von Diamidinen an Mäusen**

von
Detlef Walter Dann
aus
Hamburg

1977
7



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546214_0061

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Volker Becker

Vergleichende histologisch-fluoreszenzoptische Untersuchungen von Diamidinen an Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Detlef Walter Dann
aus
Hamburg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. med. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. med. H. Schmidt
Korreferent: Prof. Dr. med. V. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 7. 1977

I. Einleitung

DAPI (4-, 6 Diamidino-2-phenylindol) und drei weitere Analoge gehören zur Wirkstoffgruppe der Diamidine, welche bei Protozoen-Infektionen eingesetzt werden, darunter der afrikanischen Trypanosomiasis (Schlafkrankheit des Menschen, Nagana der Rinder, Überträger Tse-Tse-Fliegen). Sie befinden sich noch im tierexperimentellen Teststadium. Es handelt sich um eine Weiterentwicklung des Berenil^R (DANN et al., 1970). Sie zeichnen sich neben der pharmakologischen Wirkung durch teilweise starke Fluoreszenz aus, sind gegenüber früheren Diamidinen bei Einwirkung von Licht relativ stabil, damit stabiler in der Wirkung (keine Umlagerung) und weniger toxisch.

Dieser Fortschritt besteht chemisch in der stabilen Verknüpfung der Diamidino-Seiten durch eine Phenyl-Indolbrücke. Die Diamidine liegen meist als schwacher Basenteil eines Salzes vor, wobei der Säureteil gewöhnlich Hydrochlorid ist. Als schwache Säuren sind sie hydrophil. Es wird erwartet, daß sie sich im wässrigen Medium des Blutstroms in alle Organe verteilen.

Das pharmakologische Wirkprinzip bei Trypanosomiasis ist nicht ganz bekannt. Sicher ist, daß sie in den Eiweiß- und Nucleinsäurestoffwechsel (DNA, RNA, Chromosomen, Mitochondrien) eingreifen. Aus verschiedenen Untersuchungen, zuletzt von SCHNEIDL et al., ist bekannt, daß sie sich u.a. fast selektiv an den Basen Adenin und Thymin reichen DNA anlagern und hier zur Identifizierung und Darstellung der Chromosomen verwandt werden.

Im Drug Evaluation Program des National Cancer Institute, Bethesda Md., USA, wurden DAPI und Analoge auf cytotoxische Wirkung getestet. Zwei erwiesen sich als wirksam gegen Mäuseleukämie (O. DANN, mündl. Mitt.): Die Substanz 261/96 steigerte die Überlebensrate von Mäusen mit P 388 lymphocytic leucemia (lymphatische Leukämie) gegenüber nicht behandelten Kontrolltieren auf 137 - 140 %, die Substanz 150/129 bei Mäusen mit L 1210 lymphoider Leukämie auf 138 - 193 %. Man kann annehmen, daß

auch hier der therapeutische Effekt im Eingriff in den Nucleinsäure-Stoffwechsel besteht.

Die beiden Tatsachen, Diamidine wirksam gegen Trypanosomen und wirksam bei lymphatischer Leukämie der Maus, führten zu der Frage, ob dem wohl verschiedene Wirkmechanismen unterliegen. Als Weg zur Beantwortung dieser Frage erschien es interessant nachzuprüfen, ob die differente nosologisch-therapeutische Wirkung sich auch durch unterschiedliche Anreicherung von Diamidinen in verschiedenen Organen oder Organsystemen manifestiert.

II. Material und Methode

Als Versuchsubstanzen aus der Reihe der Diamidine wurden zwei trypanozide Verbindungen mit den Nummern 102/198 (= DAPI, bisher wirksamstes Trypanocidum) und 268/73 verwendet. Von den antileukämischen Verbindungen wurden die oben erwähnten Nummern 150/129 und 261/96 gewählt. Als Versuchstiere wurden weiße Labormäuse vom Stamm NMRI (Reinzuchtstamm), Original Kiesslegg, aus einer Zucht in Kiesslegg im Allgäu, im Alter von etwa 6 Wochen mit einem Körpergewicht um 25 g verwendet.

Die Methode der Wahl zum Organnachweis der Diamidine ist die fluoreszenzoptische Betrachtung. Denn die Diamidine weisen eine vorzügliche und über mehrere Minuten nur wenig abnehmende eingene Fluoreszenz im UV-Bereich auf (Diss. KALIWODA). Diese Eigenfluoreszenz wird durch eine geeignete Filterkombination am Zeiss-Fluoreszenzmikroskop (großes Universalmikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung) dem Betrachterauge selektiv sichtbar gemacht.

Als einfaches und geeignetes Objekt der Betrachtung bietet sich der ungefärbte, übliche histologische Organschnitt an. Diese Möglichkeit wurde in ausführlichen histologischen und fluoreszenzoptischen Vorversuchen studiert und erarbeitet. Den Versuchsmäusen wird die dosierte Prüfsubstanz intraperitoneal mit einer Bolus-Injektion appliziert. Nach verschiedenen langen Einwirkzeiten (= Überlebenszeiten) nach der Injektion wurden die Versuchstiere getötet, die

zu untersuchenden Organe sofort entnommen und fixiert.

Die üblichen, aber ungefärbten histologischen Organ-schnittpräparate wurden in weitestgehender Eigenarbeit hergestellt. Der Reihe nach wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop gemustert, die gesichteten Befunde protokolliert und soweit als möglich quantifiziert. Die gesichteten Befunde waren im Zuge der Auswertung dem Vergleich untereinander und einer möglichen Beziehungsstiftung oder Zusammenhangsfindung zugänglich.

In einem zweiten Präparatedurchgang wurden die gleichen Befunde zur Objektivierung und Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop photographiert und damit fixiert.

III. Versuchsablauf einschließlich Vorversuche.

1.) Tierexperimenteller Teil.

a) Herstellung der Injektionslösungen. Die vier Versuchsubstanzen wurden dankenswerter Weise von dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie zur Verfügung gestellt.

Die Basengehalte der Substanzen, also der wirksame Anteil der gewogenen Substanzmengen waren:

102/198	BG (Basengehalt)	60,6 %
268/73		81,2 %
150/129		82,5 %
261/96		84,5 %

Die Dosierung aller vier Substanzen betrug einheitlich 20 mg/kg Körpergewicht, was bedeutet, daß die übliche therapeutische Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht verdoppelt wurde. Da es hier weniger auf therapeutische Effekte als auf "Vitalanfärbung" ankam, zudem eine einmalige Injektion gegeben wurde, konnte man mit gutem Gewissen höher dosieren.

Das Einwiegen der benötigten Substanzmengen geschah an der Mikrowaage auf 1/10 mg genau.

Die einzuwiegende Menge wurde wie folgt berechnet (mit einem kleinen Überschuß für Verspritzen der Versuchstiere, schwerere als Durchschnittstiere etc.):

Zahl der pro Substanz angesetzten Tiere (8 + 8 Kontrolltiere)

x

durchschnittliches Körpergewicht (ca. 25 g)

x

20 : 1000 (= 20 mg/kg Dosierung)

x

100 : BG in % (z.B. 60,6, wenn bei 102/198 der Basengehalt 60,6 % beträgt).

Die Dosierung bezog sich nicht auf die Substanz als Ganzes, sondern auf deren wirksamen Anteil, die Base. Bei der obigen Rechnung ergab sich durch Multiplikation der ersten drei Multiplikatoren die wirksame Basenmenge, bei Multiplikation aller Multiplikatoren die einzuwiegende Substanzmenge.

Das zu injizierende Mittel mußte in Lösung vorliegen.

Diese Lösung ließ sich bei Hydrophilie der Diamidine mit Aqua dest. herstellen. Als Injektionsquantum wurde aus Gründen der Berechenbarkeit und Verträglichkeit für die Mäuse 1/100 des Körpergewichts gewählt, also für eine 20 g-Maus 0,2 g, entsprechend 0,2 ml.

Um zur Gesamtlösungsmittelmenge zu gelangen (pro Substanz), wurde weiter folgende Rechnung angestellt: Die Injektionsmenge sollte 1/100 Körpergewicht betragen. Bei Dosis 20 mg Base pro kg Körpergewicht mußte also die Lösungsmenge 1/100 eines kg betragen, d.h. 10 mg entsprechend 10 ml.

Man bekam also eine Lösung, bei der das Verhältnis Basenmenge zu Lösungsmenge 2 : 1 betrug (20 mg in 10 ml). -

Zur Herstellung der eigenen Lösung wurde die aktuell abgewogene Substanzmenge mit der Hälfte des numerischen Betrages der errechneten Basenmenge (pro gleicher Substanz) in ml gelöst. -

Für die einzelnen Substanzen ergaben sich daraus folgende Quantitäten:

Subst.Nr.	Subst.menge	BG	Basenmenge	Lösungsmenge
102/198	22,6 mg	60,6 %	13,69 mg	6,84 ml
268/73	16,6 mg	81,2 %	13,47 mg	6,73 ml
150/129	14,5 mg	82,5 %	11,96 mg	5,98 ml
261/96	14,9 mg	84,5 %	12,59 mg	6,24 ml

Mit den gewogenen Substanzmengen und den errechneten und abgemessenen Lösungsmittelmengen Aqua dest. wurden die Injektionslösungen hergestellt.

Die Substanzen 198 und 73 gingen als Pulver im Aqua dest. bei Zimmertemperatur schnell und vollständig in Lösung, nachdem sie kurze Zeit im Erlenmeyer-Kölbchen geschüttelt waren. 150/129 löste sich auch nach vorsichtigem Erwärmen des Kolbens nicht vollständig auf. Nach 10 Minuten Eintauchen ins Ultraschallbad entstand auch nur eine milchig-trübe Lösung (Suspension), welche jedoch, auch unter Lichtausschluß, bei Aufbewahren im Kühlschrank nicht mehr ausfiel. Sie erschien lediglich am Boden etwas dichter. 150/129 ging erst nach vorsichtigem Erwärmen über der Bunsenflamme auf etwa 45°C vollständig in Lösung. Zur Vorsicht wurde es noch zusätzlich 3 Minuten lang ins Ultraschallbad getaucht. Die Lösung blieb klar.

b) Injektionsbesteck.

Zur Injektion der Mengen in der Größenordnung von 0,2 ml wurden die handelsüblichen Tuberkulinspritzen verwendet, für jede der vier Substanzen eine frische. Die Injektionskanülen hatten die Größe Nr. 18.

Injektionstechnik: Die Tiere, welche zur Applikation derselben Substanzen vorgesehen waren, wurden in einem Käfig jeweils zusammengefaßt. Es waren also vier Käfige. Die Tiere wurden nun einzeln gewogen (auf 1/10 g genau). Gleich nach dem Wiegen wurde unter Assistenz die dem Gewicht entsprechende Lösungsmittelmenge intraperitoneal in einem Zug verabreicht.

c) Injektionstechnik: Weiträumiges, kräftiges Packen am Nackenfell zwischen den Ohren mit dem linken Daumen und dem linken Zeigefinger. Umwenden der Hand, so daß die Wirbelsäule des Tieres in die Hohlhand zu liegen kam, und gleichzeitig Einschieben des Schwanzes der Versuchsmaus unter den eingeschlagenen linken Kleinfinger. Damit war der Körper der Maus fixiert, so daß sie nicht sich wehren konnte. Insbesondere das Abdomen war straff gespannt. Vor der tangentialen Injektion in den rechten Unterbauch, also auf der daumenwärtigen Seite der linken

Hand des Versuchsleiters, wurde die Maus in Kopftief-
lage gehalten. Dies geschah in der Vorstellung, daß das
Gekröse dadurch nach diaphragmal gedrängt würde und so
eine akzidentelle Injektion in das Darmlumen oder die
Punktion eines Organs vermieden würden. In spitzem Win-
kel wurde die Kanüle in den rechten unteren Quadranten
der Bauchwand eingestochen und vorgeschoben, bis man
durch ein ruckartiges Nachgeben des Widerstands ver-
spürte, daß die Bauchdecken passiert waren. Dann wurde
die Kanüle flach gelegt und die dem Gewicht entsprechende
Menge durch Kolbendruck an der Plastik-Tuberkulinspritze
injiziert.

Das Wiegen und die intraperitoneale Applikation der
Substanzen dauerte für 16 Tiere etwa 7 Minuten, pro
Tier also etwa 25 Sekunden.

d) Verträglichkeit.

Bei 198 und 73 waren die Tiere ca. 1/2 bis 1 Stunde zum
Teil träge oder verhielten still in einer Ecke des Käfigs.
Bei 129 und 96 war dies Verhalten nicht ausgeprägt resp.
häufig. Keines der Tiere verstarb während der Versuchs-
dauer spontan. Einmal wurde eine eitrige Peritonitis be-
obachtet, wohl durch Eröffnung resp. Punktion des Darm-
lumens. Fatal war dieser Zwischenfall nicht.

e) Versuchsdauer / Versuchszeiten.

Keine Injektion	M 0	2 Tiere		
Intervall zw. Injektion und Versuchsende				
15 mi n.	M 1	A + B	8 Tiere	4 Subst.
1 Std.	M 2	A + B	8 "	4 "
4 Std.	M 3	A + B	8 "	4 "
1 Tag	M 4	A + B	8 "	4 "
4 Tage	M 5	A + B	8 "	4 "
1 Woche	M 6	A + B	8 "	4 "
2 Wochen	M 7	A + B	8 "	4 "
4 Wochen	M 8	A + B	8 "	4 "

Die Versuchsdauer betrug längstens 4 Wochen, es wurden
64 und 2 Kontrollmäuse eingesetzt, 4 Substanzen getestet.
32 der Tiere sind Kontrolltiere, um etwaige Ausfälle über-
brücken zu können.

f) Versuchsdurchführung.

Die Tiere jeder der vier Gruppen wurden nacheinander gespritzt. Beim Spritzen wurden die ersten zwei Tiere sofort getrennt, da sie bereits nach 15 Minuten (Dauer der Injektionsserie 7 Minuten) lt. Versuchsplan getötet werden mußten.

Nach 15 Minuten wurde von M 1 Tier A ein Blutausstrich angefertigt. Die Schwanzspitze wurde kupiert, ein Tropfen Blut bei venöser Stauung an der Schwanzwurzel auf einen Objektträger abgestrichen und in der üblichen Technik mit nach hinten schräggestelltem Deckglas ausgestrichen.

Nach Anfertigen des Blutaustriches wurden die ersten separierten Tiere in einem geschlossenen Gefäß kurz einer Ätherdampfatmosphäre ausgesetzt und im Toleranzstadium dieser Narkose durch Genickschlag getötet. Entsprechend dem obigen Zeitplan wurde bei allen übrigen Paaren von Mäusen in gleicher Weise verfahren.

Die 15 Minuten-Tiere und ein Teil der 1 Stunden-Tiere wurden am gleichen ersten Versuchstag seziert. Die restlichen 1 Stunden-Tiere und die 4 Stunden-Tiere wurden an den beiden darauf folgenden Tagen seziert. Sie waren so lange im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Die Tiere aus den restlichen Versuchszeiten wurden am selben Tage getötet und seziert.

Eine einzige Sektion dauerte selbst nach Einarbeitung 30 bis 35 Minuten.

Sektionstechnik: Rückenlage der Kadaver. Stecknadelfixierung der vier extendierten Extremitäten auf einer Paraffinplatte. Medialer Schnitt auf der Abdominalseite des Stammes vom Jugulum bis zum äußeren Genitale. Fassen der Bauchdecken mit der Pinzette. Spalten des Thorax beidseits des Sternum und Isolieren des Sternum.

Die vor Versuchsbeginn festgelegte Anzahl der zu entnehmenden Organe legte auch die Abfolge der Sektion fest. Die Wahl der Organe konzentrierte sich vornehmlich auf die parenchymatösen Organe, da hier der Hauptwirkort der Diamidine liegt.

Folgende Organe wurden entnommen:

Sternum-Knochenmark
Lunge-Leber-Niere-Milz
Pankreas-Parotis-Mesenterialwurzel
Herzmuskel und Skelettmuskel (Adduktoren des Femur)
Vagina, Ovarien und Tuben
Großhirn und Kleinhirn
Haut

Alle Organe wurden sofort bei der Sektion in ein Behältnis mit 5 % Formalinlösung gegeben und dort mindestens 24 Stunden bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung fixiert.

2.) Histologisch-präparativer Teil des Versuchs.

a) Vorbemerkung.

Die Fixierung in Formalinlösung war theoretisch problematisch. Es ist bekannt (Literatur bei PEARSE, Histochemistry), daß die biogenen Amine und vor allem die Katecholamine sowie die Tryptamine mit Formalin fluoreszierende Verbindungen ergeben. Diese Befunde wurden erhoben an Präparaten, welche als Schnitte mit HCOOH-Gas bedampft worden waren. Die wesentlichen Summanden der formaldehyd-induzierten Fluoreszenz sind Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Die fluoreszenzoptischen Anregungs- und Emissionsoptima liegen außerhalb der für die Diamidine gewählten und einschlägigen Bandbreite von 365 nm (Anregung) resp. 488 nm (Emission). - In Vorversuchen wurde der Frage von Unterschieden in der meßbaren und sichtbaren Fluoreszenzintensität von histologischen Gewebsschnitten nachgegangen. Es wurde Material verwendet, das formalin-, alkohol-, kälte- und lufttrocknungsfixiert war.

Als Gewebe diente Mäuseleber und Lebergewebe aus dem pathologischen Sektionsgut (ohne Leberkrankheiten oder makroskopische Leberveränderungen).

Bei der im Pharmazeutischen Institut vorgenommenen quantitativen Ausmessung von Ausschnitten gleicher Flächengröße und gleicher Gewebsschnittdicke zeigte sich, daß im Bereich der in dieser Arbeit verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen des UV-Bereichs nur Intensitätsunterschiede in der Größenordnung von etwa 5 % zu verzeichnen waren. Da hier generell die Methode der Auffindung und Intensitätsschätzung

der Fluoreszenz im histologischen Präparat mittels des menschlichen Auges gewählt wurde, konnte die Zusatzfluoreszenz durch biogene Amine im 1 bis 5 %-Bereich vernachlässigt werden.

Eiweißglycerin als Bindemittel zwischen Objektträger und Gewebsschnittpräparat ist das übliche Bindemittel. Da nach PEARSE alle Eiweißstoffe fluoreszieren können, wurde nachgeprüft, ob die Verwendung dieses Stoffes die Ergebnisse beeinträchtigen oder verfälschen könne. Dazu wurden Stücke parenchymatöser Organe aus dem Sektionsgut nach Fixierung aufgezogen auf den Objektträger a) mit Eiweißglycerin, b) mit Gelatine, c) Kontrolle mit leeren Objektträgern, Gelatine- und Eiweißglycerin-beschichtet.

Bei den leeren Objektträgern bestand der Unterschied lediglich in einem differierenden hellen Grauton bei der Betrachtung. Die Leber- und Nierenpräparate zeigten auf Eiweißglycerin eine eben erahnbare erhöhte Helligkeit ("Grundfluoreszenz") gegenüber den Gelatine-Präparaten. - In unseren Versuchen würde bei der Verwendung von Eiweißglycerin diese geringe Steigerung der Helligkeit allen Präparaten zukommen (konstanter Fehler). Sie konnte somit bei Intensitätsvergleichen und Organstudien vernachlässigt werden. Die Verwendung von Eiweißglycerin konnte nicht als verfälschend eingestuft werden.

b) Herstellung der Schnitte.

Nach Fixierung der Organe für mindestens 24 Stunden wurden aus diesen Stücke zur Weiterverarbeitung herausgeschnitten. Diese Gewebsstücke wurden zum Entzug des Wassers und Herauslösen von Fett inkubiert in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 80 und 96 % Alkohol), danach in Aceton, auf jeder dieser Stationen für mindestens eine Stunde. Anschließend wurden die Blöcke in flüssiges Paraplast (Paraffin) versenkt, bei einer Temperatur von 65°C für mehrere Stunden. Die so vorbereiteten Stücke wurden dann ebenfalls bei 65°C in Paraffinblöcke ausgegossen.

Von jedem Block, in welchem je nach Größe und Gewebeskonsistenz bis zu vier Organe enthalten waren, wurden drei Schnitte gemacht. Zwei Schnitte davon befinden sich auf einem Objekt-

träger, der für die fluoreszenzoptische Betrachtung vorgesehen ist. Ein einzelner Schnitt wird einer Weiterbehandlung mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Dieser mit der histologischen Routinefärbung behandelte Schnitt diente als Kontrollschnitt. Er sollte u.a. die Auffindung von Organen erleichtern, wenn mehrere Organbröckel in einem Block ausgegossen waren (z.B. Pankreas und Speicheldrüsen) und für weitere Untersuchungen dienen, wenn fluoreszenzoptische Befunde von Diamidinen mit lichtmikroskopischen in Beziehung gesetzt werden sollten.

Die beiden ungefärbten und unbehandelten Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie wurden zweimal im Xylolbad entparaffiniert für jeweils 10 Minuten, anschließend mit Eukitt die Deckgläser aufgezogen. Eukitt zeigt, wie im Rahmen der Vorversuche geklärt wurde, makroskopisch keine Fluoreszenzunterschiede gegenüber Caedax, einem modifizierten Kanada-Balsam.

3.) Auswertung

a) Auswertungskriterien.

Die Auswertung umfaßte die eingehende Musterung aller Präparate unter dem Gesichtspunkt, in welchen Organen und Organteilen, in welchem Ausmaß und zu welchem Zeitpunkt des Versuchsablaufs Fluoreszenz antreffbar war. Die Befunde wurden registriert in einem Tabellarium (vergl. Anhang). Hier gilt eine Tabelle für jeweils ein bestimmtes Organ über die ganze Versuchsdauer hinweg (8 Kontrollpunkte), und für alle vier Testsubstanzen. Die Registrierung wurde durch quantifizierende Intensitätsstufen verfeinert. Die Skala wurde wie folgt unterteilt:

- keine Fluoreszenz
 - (+) geringe Fluoreszenz, keine Strukturen
 - + deutliche Fluoreszenz, Strukturen, Kerne, Membranen
 - ++ starke Fluoreszenz = Färbung, helles Leuchten im Bild
 - +++ sehr starke Färbung von Strukturen, Zellteilen etc.
- Gran. = Granulationen: fluoreszierende Körnchen im Cytoplasma.
diff. = diffus: flächige, hellbläuliche homogene Hervorhebung von ganzen Zellen oder Gewebspartien.

Die offene Fragestellung der Auswertung lautete: Zeigen die vier hier verwandten Diamidine differenzierende Affinität zu verschiedenen, vor allem parenchymatösen Organen oder differenzierten Zellen? Treten folglich Unterschiede im zeitlichen/örtlichen Muster der Organanfärbung/Imprägnation auf?

b) Fluoreszenzoptische Daten der Substanzen.

Die vier eingesetzten Diamidine unterscheiden sich neben verschiedener Löslichkeit und Basengehalt (siehe oben) in ihrer Fluoreszenz, welche einen bläulichen bis helleren Charakter hatte, nach verschiedenen Absorptions- und Emissionswellenlängen (Optima). Je länger die ausgesandte Wellenlänge (Betrachtung) ist, also dunkler, desto schwieriger unterscheidbar sind die Intensitätsgrade.

Die Werte für die vier Diamidine sind:

Substanz	Anregungswellenlänge	Fluoreszenzwellenlänge
102/198	340 - 351 nm	467 - 488 nm
268/73	372 nm	500 - 510 nm
150/129	354 - 374 nm	ca. 420 nm
261/96	360 - 370 nm	420 - 430 nm

Die Wellenlängenangaben, welche einen gewissen Bereich umfassen, sind geschätzt bzw. angenommen oder extrapoliert.

Alle Präparate wurden in einem großen Universalmikroskop der Firma Zeiss mit Fluoreszenz-Zusatzeinrichtung im abgedunkelten Raum betrachtet. Eine UV-Quecksilber-Hochdrucklampe war die Anregungsquelle. Aus ihrem Spektrum wurde mittels der Erregerfilterkombination BP 365/11 (Zeiss) die 365 nm-Linie ausgewählt. Die Absorptionsfilterkombination war UG 1 LP 418, so daß alle kurzwelligeren UV-Teile weitgehend weggefiltert waren. Zusätzlich wurde ein Sperrfilter 420 - 495 verwendet, der insbesondere das Emissionsoptimum von DAPI = 102/198 traf.

Die Objektivstärke betrug für die Auswertung und die photographische Registrierung 25/Apertur 0.60, die Okularstärke beidseits 8,0.

Mit dieser optischen Kombination konnte an dem Gerät immer eine für unsere Zwecke ausreichende Vergrößerung und gleichzeitig Lichtstärke erreicht werden. Das Optimum war nicht bei allen Substanzen zu erreichen, da die dafür selektive Filterkombination nicht auf dem Markt war. - Daher ergab sich der Nachteil, daß für die Substanzen 150/129 und 261/96 das Emissionsoptimum nicht erschien. Somit waren die Intensitätsangaben einerseits unter den Stoffen 129 und 96 gut zu vergleichen, andererseits unter den Stoffen 198 und 73. Ein Intensitätsvergleich aller vier Substanzen untereinander war somit nur eingeschränkt möglich.

Die Organe von je vier Versuchstieren mit identischer Versuchsdauer (entsprechend den vier Substanzen) wurden der Reihe nach durchmustert. Nach der Besichtigung jedes Präparates/Organs wurde der erhobene Befund nach Lokalisation, Intensität und etwaigen Besonderheiten in den vorbereiteten Protokollbogen eingetragen. Die Ordinaten auf den Bögen waren Versuchsdauer und verwendete Substanzen.

Von den Organen, welche entnommen worden waren, wurden nicht untersucht die Genitalorgane (Uterus, Tube und Vagina), welche einer eigenen Studie vorbehalten bleiben sollen.

Als Kontrolle und O-Standard wurden die Organe von zwei etwa gleichschweren Versuchstieren angesehen, welche keine Diamidininjektion erhalten hatten.

Prinzip der Registrierung war, ob die spezifischen Funktionszahlen (Kerne) eines Organs dargestellt waren (fluoreszierend) oder nicht. Das universelle Bindegewebe mit seinen verschiedenen zellulären Erscheinungsformen, welches von allen vier Substanzen zuerst und bevorzugt angefärbt wurde, ist nicht berücksichtigt worden.

IV. Ergebnisse

Vorversuche.

Die umfangreichen Vorversuche zu den vorliegenden Experimenten beschäftigten sich mit dem Problem, wie die Diamidine, insbesondere DAPI, postmortales Organgewebe aus dem Sekretionsgut anfärben. Daneben wurden oben besprochenen Probleme

der formalininduzierten Fluoreszenz, der Fluoreszenz der biogenen Amine und des Bindemittels auf dem Objektträger untersucht.

Die wesentlichen Ergebnisse waren folgende:

Mikrotomschnitte von 3 Dicke ließen sich durch Inkubation in 0,01 %iger DAPI-Lösung bei Zimmertemperatur (oder 0,001 %iger DAPI-Lösung bei 37°) bei einer Eintauchdauer von 5 Minuten befriedigend anfärben. Es stellten sich Kern- und viele Cytoplasmastrukturen dar. Von den untersuchten Organen, deren Liste mit der im Hauptversuch eingesetzten identisch war, waren Pankreas und Lunge unbefriedigend dargestellt. Sie waren überfärbt. Alle Kern- und Plasmastrukturen fluoreszierten hier. Eine Differenzierung der cytoplasmatischen und Kernstrukturen war nicht mehr möglich.

Gefrierschnitte mit dem Kryostat von 10 Dicke gaben, wenn sie bei vorsichtiger Behandlung während des Eintauchvorgangs nicht abschwammen, ebenfalls brauchbare färberische Ergebnisse. Gefriermikrotomschnitte von 20 Dicke eigneten sich aus verschiedenen Gründen (Dicke, Überfärbung, Abschwimmen) nicht für dieses Färbeverfahren.

Abklatschpräparate und Ausstriche des Knochenmarks zeigten bei subtiler, vorsichtiger Technik mit schonender Fixierung rechte gute Färbung und Differenzierbarkeit der Kernstrukturen. Knochenmarkschnittpräparate waren wegen der umfangreichen und eingreifenden Vorbehandlung schlecht brauchbar, weil zu undifferenziert dargestellt.

2.) Sämtliche Ergebnisse der fluoreszenzoptischen Betrachtung (Hauptversuch) sind in den beiliegenden Tabellen aufgeführt. Dort sind auch die kleineren Details und Randbefunde notiert.

Bei der Betrachtung stellte es sich heraus, daß 3 Tiere bzw. deren Organe keine Färbung zeigten. Es mußte angenommen werden, daß diese Tiere nicht ordnungsgemäß gespritzt waren. Nach Aufarbeitung der parallelen Kontrolltiere, welche auch eine Injektion erhalten hatten, zeigten sich verwertbare Resultate. Ein Tier wies eine Peritonitis auf, ohne daß eine Beeinträchtigung des Befindens

deutlich wurde. Die Organe dieses Tieres zeigten gleichwohl verwertbare Fluoreszenz. - Nach Übersicht des Protokolls war zu schließen, daß drei weitere Tiere, deren Organe keine oder eine nichtadäquate, sehr schwache Fluoreszenz zeigten, wohl ebenfalls nicht sachgemäß gespritzt worden waren. Insgesamt kann man somit festhalten, daß die angewandte Injektionstechnik bei 7 von 64 Tieren nicht zum gewünschten Erfolg führte.

Im Verlauf der Inspektion der Organe zeigte es sich bald, daß die Substanzen 198 und 73 fast immer gleichartige Befunde lieferten, nur der Grad der Intensität der Fluoreszenz war bei 73 höher. Ebenso wurde weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Verhalten der Substanzen 129 und 96 gefunden. Dies war neben der Fluoreszenzintensität die Aussparung bestimmter Organe und Epithelien von parenchymatösen Organen. Im folgenden wird deswegen jeweils von Substanzpaaren gesprochen. Die Einzelsubstanzen werden mit ihrer zweiten Kennziffer deutlich gemacht.

3.) Organe.

Großhirn: Neuronen speichern die Substanzen nicht, Gliazellen nur vereinzelt und schwach. Die Plexus chorioidei und Pia mater sind meistens und über lange Zeit (2 Wochen) brillant dargestellt. Auch das Ependym ist im Gegensatz zur grauen und weißen Substanz über lange Zeit sehr gut angefärbt.

Kleinhirn: Bei zwei Proben, welche nach negativem Ergebnis bei den A-Tieren nachgeschnitten worden waren, scheinen sich die Substanzen 129 und 96 im Kleinhirn anzureichern, eher noch in der Körnerzellschicht als in den Purkinje-Zellen. Als solitärer Befund ist dieser Hinweis auf positive Färbung allerdings fragwürdig. Öfters als beim Großhirn ist auch bezüglich der anderen Teststoffe ein eingeschränkt positiver diffuser Farbschimmer im Protokoll vermerkt.

Lunge: Nach 4 bis 24 Stunden zeigen Bronchusepithel und Interstitium von 198 und 73 eine Färbung, die bis nach 4 Wochen nur wenig abnimmt. - 129 und 96 haben keinen Effekt an der Lunge.

Leber: Bereits nach 15 Minuten Einwirkzeit von 198 und 73 sind Epithelien und Kupffer-Zellen massiv tingiert, sogar cytoplasmatische Granula treten auf. Im Laufe des 4-Wochen-Intervalls nimmt die Färbung erst der Leberepithelien, dann die Granula und nur ganz zögernd die Färbung in den Kupffer-Zellen ab.

129 und 96 zeigen erst nach einem Tag eine deutliche Färbung, wobei die Epithelien dauernd blasser sind als die Sternzellen. Geringe Granulation tritt nur intranucleär auf, nicht cytoplasmatisch. Die Sternzellen sind auch hier am längsten positiv.

Nebenbefund: Nach zwei Wochen zeigt das HE-Bild der Leber eine geringe Epitheldissoziation um die Zentralvene herum, keine Zellnekrosen jedoch (Substanz 73).

Niere: Eine fast maximale Imprägnation des proximalen Tubulussystems ist schon nach 15 Minuten bei 198 und 73 zu registrieren, nach einer Stunde treten zusätzlich intraplasmatische Granula auf. Der Ort des Fluoreszenzmaximums verschiebt sich während der vier Wochen Versuchsdauer vom proximalen Tubulussystem zum distalen Teil (Tubuli recti). Die Intensität nimmt auch ab. Die Pointe ist, daß auch die cytoplasmatischen Granulationen von der Rinde markwärts wandern, aber nur bis zu den Tubuli recti, nicht bis in die Sammelrohre. Die Sammelrohre zeigen zum Schluß eine diskrete Anfärbung. Konstantes Merkmal der Stoffe 198 und 73 ist die Aussparung der Glomeruli.

129 und 96 erscheinen in der Niere erst nach einer Stunde, während der Versuchszeit viel schwächer, wandern aber konstant über die Tubuli recti hinaus bis in die distalen Sammelrohre vor bei gleichzeitiger Entfärbung der Rinde. Frappant ist die distinkt-schwache Anfärbung der Glomeruli einzig durch die Substanz 96. Mit dieser Ausnahme ist das Verhalten von 129 und 96 gleichsinnig, jedoch schwächer als von 198 und 73.

Milz: Die Stoffe 198 und 73 sind während der gesamten Versuchsdauer nur schwach anzutreffen. Die rote Pulpa ist ausgespart. Die weißen Milzfollikel stellen sich nur zögernd nach 4 Stunden dar. Die Unterscheidung der Retikulumzellen, die sich als Teil des Bindegewebes wie oben festgestellt

immer gut färben, ist schwierig. -

Die Substanzen 129 und 96 zeigen gegenüber den anderen DAPI-Analogen noch geringere Anfärbung. Immerhin reicht sich 96 deutlich und stark in den Follikeln an. Einen prinzipiellen Unterschied zwischen den Stoffen 129 und 96 kann man nicht feststellen.

Herzmuskel: Schon nach 15 Minuten sind die Stoffe 198 und 73 stark vertreten. Sehr auffällig ist die intrazelluläre Granulation, ohne daß sich die Kerne gleich mit darstellen. Erst nach 4 bis 7 Tagen werden die Kerne positiv. Im weiteren Verlauf bleibt die Dominanz der Granula erhalten, so daß nach 4 Wochen nur noch die Kernmembran zart konturiert ist, die Granula jedoch deutlich persistieren. Auffällig ist, daß die Muskelmasse (Zellverbände) nicht homogen, sondern fleckförmig angefärbt sich zeigt. So wechseln Partien starker Färbung mit solchen ohne jede Färbung ohne erkennbare Regel ab. Weiter verdient Beachtung, daß die Nucleoli der Herzmuskelzellkerne zeitlich vor der Kern-DNA positiv werden.

Das Paar 129 und 96 ergibt keine Darstellung der Herzmuskelzellen, allenfalls sieht es so aus, als ob gelegentlich und partienweise ein bläulicher homogener Schimmer des Cytoplasmas bestehe.

Skelettmuskel: Die Befunde von 198 und 73 bezüglich zeitlichem Auftreten, partienweiser Lokalisation, Dominanz der cytoplasmatischen Granula usw. sind praktisch gleich denen beim Herzmuskel. Erstaunlich ist, daß in den Intervallen von 1 und 4 Stunden die Querstreifung einzelner Muskelfascikel ganz plastisch fluoreszierend hervortritt, einer der histologisch-ästhetischen Genüsse des Versuchs. - Das Paar 129 und 96 erscheint beim Muskel auch nur gelegentlich als schollig-fleckige Blautinktur.

Parotis: Die Ausführungsgänge werden durch 198 und 73 nach einer Stunde prominent dargestellt. Erst nach ein bis vier Tagen folgt die Anfärbung der Epithelzellen nach. Noch davor treten Granula auf, diese jedoch bevorzugt und nach vier Wochen nur noch, in den Zellen der Ausführungsgänge. Die Epithelzellen fluoreszieren nach zwei Wochen nicht mehr.

- Das Paar 129 und 96 erscheint nicht in der Parotis, gelegentlich sieht es so aus, wie wenn 129 sich doch in den Zellen der Ausführungsgänge etwas zeige.

Pankreas: Das Paar 198 und 73 färbt, sobald es nach 15 Minuten bis einer Stunde erschienen ist, die Inseln eindeutig stärker an als das sekretorische Parenchym. Diese Anreicherung in den Inseln bleibt während des Versuchs erhalten. Bei 73 treten in den Inseln Granula auf.

- Die Substanz 129 erscheint nicht, 96 nur sehr diskret, wobei deutlich die Anreicherung der Parenchymzellen (Inseln negativ) aufscheint.

Knochenmark/Sternum: Das Paar 198 und 73 gibt die Mehrzahl der positiven Befunde. Präparat 73 erscheint schon nach 15 Minuten im Sternalmark, wobei einzelne Großkerne in großen Zellen, welche Megakaryozyten entsprechen dürften, dargestellt werden. Nach 4 Tagen ist das Maximum erreicht, zu dem Zeitpunkt, an dem erstmals die Substanz 198 prägnant auftritt. Eine auffällige Darstellung der Markraumzellen kann man bei beiden Stoffen nicht sehen. Deutlicher fluoreszieren die Zellen der enchondralen Ossifikation: Knorpel und junge Knochenzellen.

129 und 96 bieten ein sehr schwaches und uneinheitliches Färbeverhalten. 129 tritt nur sporadisch während des ganzen Versuchs auf, und dann nicht in den Markräumen. 96 stellt sich etwas häufiger dar. Die Bevorzugung des Markraums ist schon mehr eine Interpretation, aus den Protokollnotizen nur tendenziell zu filtern.

Peripheres Blutbild: Abgesehen von Substanz 73, welche in den Leukozytenkernen kurzfristig schwach erscheint, läßt sich keine eindeutige Anfärbung einer Substanz konkret belegen.

V. Diskussion

1. Eigenschaften der Diamidine und ihrer Vorläufer.

Von den Diamidinen ist ihre gute Eigenfluoreszenz bekannt (BARBER und HENRY, zit. nach KALIWODA). Fluoreszenzoptische Untersuchungen (PEARSE) sind, nachdem KÖHLER die Methode

1904 inauguriert hatte, seit 1941 durch COONS in die medizinische Methodik fest aufgenommen. Er hatte durch Untersuchung der Antikörperreaktion mit diesem Mittel die Entwicklung stark angeregt.

Das Phänomen der Fluoreszenz besteht darin, daß der fluoreszierende Stoff durch Licht definierter Wellenlänge angeregt wird und nun seinerseits Licht mit einer längeren Wellenlänge als der der Anregung aussendet. Bei Autofluoreszenz handelt es sich um Fluoreszenz ohne künstliche Anregung. So zeigen Kollagene und elastische Fasern eine blaugrüne, porphyrine eine rote, alle Proteine eine gewisse schwache Eigenfluoreszenz, mehr dagegen bei einer Anregung von etwa 250 nm.

Die Diamidine hingegen haben eine induzierte Fluoreszenz, da sie angeregt werden müssen. Schon 1932 bzw. 1935 (PEARSE) untersuchte JANSKO den Flavinabkömmling Acriflavin (Synthalin^R) als trypanocides Medikament fluoreszenzoptisch.

Die Ursache der Fluoreszenz dürften die Diamidino-Gruppen sein. Die früheren Diamidine hatten als Mittelstück eine aliphatische Kohlenstoffkette. Ihre Fortentwicklung, unter anderem Pentamidin und Stilbamidin, wiesen vor den Amidino-Gruppen jeweils einen Benzolring auf. Deren Fluoreszenz war sehr kurz, instabil und mit der Betrachtungsdauer rapide abnehmend. Die Diamidine vom DAPI-Typ zeigen eine wesentlich stabilere Fluoreszenz (ca. 50 % Abfall nach 7 Minuten nach KALIWODA), was auf die sterische Festigkeit des eingesetzten Indolsystems und feste Knüpfung daran der Amidino-Gruppen zurückgeführt wird.

Die DAPI-Diamidine färben (genauer: lassen nach Anregung fluoreszieren) vorzüglich die Nucleinsäuren der Kerne. Acredin-Orange, ein weit verbreitetes Chromosomendarstellungsmittel, ist gegenüber dem bizyklischen Indol sogar trizyklisch. Die Theorie der Aminoacridine bzw. ihrer Fluoreszenzfähigkeit im Kern besagt, daß diese mit den Purin- und Pyrimidinbasen reagieren. DAPI färbt nachweislich die adenin- und thyminreichen Nucleinsäuren (SCHNEIDL).

- Für Acridin-Orange wurde ein festes Verhältnis von 1 AO-Molekül und 3 Basenpaaren gefunden, wobei die Dimethylamino-Gruppen des AO den Basen an den PO₄-Resten zwischen-

geschoben, eingereiht (interkaliert) angenommen wurden. Unter Umständen ist ein ähnlicher Mechanismus für die Darstellung der Chromosomenstränge durch die an den beiden Diamidino-Enden ebenfalls positiv geladenen DAPI-Analoga verantwortlich.

Die Wirkungsweise der Diamidine ist vielfach untersucht worden (Lit. bei KALIWODA). Anfangs stand die beobachtete Senkung des Blutglukosespiegels und die Hemmung des Kohlenhydratstoffwechsels fest. Weitere Untersuchungen verschiedener Enzymsysteme (HAWKING u.a.) wiesen auf die Inhibition der Lysin- und Arginin-spezifischen Proteinasen hin. Die Anlagerung an DNA und auch RNA und besonders die Synthesehemmung der letzten ist beschrieben worden (KALI-WODA), auch die Synthesehemmung der Phospholipide (Membranbausteine) und Proteine (Enzyme), lokalisiert in Ribosomen und Lysosomen. Weiter lagern sich die Diamidine in den Mitochondrien als Energiequellen (wohl an den Phosphatgruppen von ADP und ATP) an.

Die chemische Grundlage all dieser Wirkungen wird darin gesehen, daß die Diamidine bei physiologischem pH als positive Zweifach-Kationen vorliegen und somit eine starke Affinität zu Anionen haben (elektronegative Ladung). Anionen zeichnen die Molekülgruppen von Proteinen, Lipoproteinen, Phospholipiden, Nucleinsäuren, Mucopolysacchariden, Neuraminsäuren und anderen aus.

Unter Berücksichtigung dieser Daten konnte von DAPI und Analogen erwartet werden, daß sie sich an Stellen anreichern, die diese Stoffe wie Proteine, Nucleinsäuren usw. aufweisen.

Die Zellorte zu identifizieren, an denen diese (Groß-) Moleküle auftreten, kann die Lichtmikroskopie mit ihrer beschränkten Auflösung nicht leisten, höchstens die Elektronenmikroskopie. Statt der Zellorte lassen sich nur die Zellansammlungen oder Organe ausmachen, wo die Eiweißstoffe und damit auch ihre Anfärbungen durch die Amidine massiert sind. Theoretisch wären stoffwechselaktive (Eiweiß- und Enzymproduktion) und leistungsaktive (Bewegung, Sekretion) Organe als am meisten anfärbbar zu erwarten.

Dem entsprechen die Befunde unserer Untersuchungen.

2.) Eigenschaften der Substanzen in den Organen.

102/198 = DAPI, der trypanocide Wirkstoff, zeigt eine gute Darstellung der Zellkerne der parenchymatösen Organe (Leber, Niere, Pankreas), der Lymphknoten, welche akzidentell bei anderen Organschnitten mitgetroffen wurden, der Lunge, des Herz- und Skelettmuskels. Etwas stärker, aber gleichsinnig wirksam ist die Substanz 268/73. - Aus der Literatur (HAWKING) und aus mündlichen Mitteilungen sind als Ablagerungsort, was grosso modo mit Wirkort gleichgesetzt werden kann, die Nucleotide, Proteine und Peptide bekannt. Daraus könnte man, wie oben ausgeführt, auf den Mechanismus schließen als Hemmung der dort ansetzenden Enzyme. An sichtbarer Stelle stehen hier der Kern, die Kernmembran und im Cytoplasma die Mitochondrien als gerade noch sichtbare (Vergrößerung!) Organellen. Ribosomen sind von der optischen Auflösung her als solche nicht mehr auszumachen. - Es wird vermißt eine Anfärbung wesentlichen Ausmaßes im Groß- und Kleinhirn. Eine geringe Anfärbung hat statt in Lunge und Knochenmark. Ekkrine Drüsen erscheinen gut (Parotis, Bronchi, Sekretionsphase des Uterusepithels), weniger des Pankreas.

150/129 und 261/96 als antileukämische Substanzen sind bei der experimentellen induzierten Mäuseleukämie als wirksam bezogen auf die Überlebenszeit befunden worden. Diese Stoffe zeigen in den vorliegenden Versuchen eine schwächere Fluoreszenz, weil die Emissionsoptima mit unserer Filterkombination nicht erreicht werden. Auch kann die Fluoreszenzintensität im langwelligeren Bereich (blau), weil dunkler, nicht so differenziert gesehen werden. Im wesentlichen zeigen sich Strukturen in folgenden Geweben: Körnchenzellen des Kleinhirns, Kupffer-Zellen der Leber, Nierenepithel (und bei 96 die Glomeruli), bei 96 weiter die weiße Milzpulpa, das Pankreasparenchym, das Knochenmark spärlich, bei 129 noch die Ausführungsgänge der Parotis.

3.) Pharmakokinetik der Substanzen.

Nach der intraperitonealen Injektion werden alle Teststoffe insoweit gut resorbiert, als eine sichtbare Färbung vieler

Organe stattfindet. Aus der Tatsache, daß das Gehirn und ein passant beobachtet das Mesenterium sowie das Knochenmark gering und die Alveolen der Lunge (Lecithine) keine Fluoreszenz zeigen, kann man schließen, daß der Stoffwechsel dieser Organe nicht so aktiv ist in Bezug auf Bildung und Umsetzung von Eiweißen.

Die Anfärbung der parenchymatösen Organe, vor allem Niere und Leber, sowie der Muskeln weisen darüber hinaus auf die Hydrophilie (vergl. Einleitung) hin. Dies Kennzeichen läßt auch die Ausscheidung zwanglos verstehen, nämlich über die Nieren.

Schon bei der Zubereitung der Injektionslösungen war aufgefallen, daß 198 und 73 sich ohne unterstützende Maßnahmen in Wasser komplett lösen. 96 und besonders 129 können nur durch zusätzliche mechanisch-physikalische Tricks in Lösung gebracht werden. Sie bleiben in diesem Medium konstant.

Die Umkehrschlußerwartung, daß schlechte Löslichkeit Nicht-Hydrophilie = Lipophilie bedeute und daß diese Stoffe eine diesbezügliche Organaffinität zeigten, ist nicht erfüllt. Jedoch läßt die Nicht-Hydrophilie die mangelnden Farbeigenschaften etwas verstehen.

Aus dem Schwanken der Fluoreszenzintensität im Verlauf des vierwöchigen Versuchs kann man ableiten, daß nach relativ rascher intravasaler Aufnahme (intraperitoneale Injektion) und cyto- wie karyoplasmatischer Inkorporation der Substanzen diese für einige Zeit, etwa 2 Wochen, in diesen Compartments verbleiben, um dann wieder langsam eliminiert zu werden. Die Tatsache, daß an erster Stelle in den Nierentubuli und Sammelrohren die Substanzen am längsten eindeutig anzutreffen sind, kann bedeuten: 1. Ort der Ausscheidung (evtl. Rückresorption), 2. besondere Affinität und feste Bindung im wässrigen Milieu.

Insgesamt ergab sich eine qualitativ eingipfelige Verteilungskurve mit kurzem ansteigendem Schenkel (Aufnahme) und längerem absteigendem Schenkel (Ausscheidung). Vergl. im Anhang die Kurven der Leber und der Niere. - KALIWODA hat jedoch eine zweigipfelige Eliminationskurve für 198 nachgewiesen. Dies könnte auch für die anderen Substanzen

zutreffen, weil unsere relativ grobe Untersuchungsmethode mit großen Zeitintervallen für die Frage der Ausscheidungscharakteristik unter Umständen nicht ganz angemessen ist.

Die Beziehung zwischen den untersuchten Organen und den vier eingesetzten Substanzen ist qualitativ ähnlich. Den Weg nach der intraperitonealen Injektion muß man sich wohl so vorstellen: Abtransport über Lymphwege (Lymphknotenanfärbung) zum rechten Herzen und über die Venenwege über den Portalkreislauf ebenfalls zum rechten Herzen, Passage der Lunge, Verteilung über den großen Kreislauf im Gesamtorganismus. Entsprechend ist nach 15 Minuten bereits der Herzmuskel gefärbt, interessanterweise zu allererst in Form intrazellulärer Granulationen. Ebenfalls nach 15 Minuten sind die Leberepithelien und Kupffer'schen Sternzellen sowie das harnbereitende System der Nieren stark angefärbt. Die Resorption über die Peritonealauskleidung könnte auch mit dafür verantwortlich sein, daß diese Parenchymorgane sich so kurzfristig darstellen.

Die übrigen Organe, wenn überhaupt angefärbt, zeigen nach einer Stunde ebenfalls eine Kernfluoreszenz. Erst nach 4 bzw. 24 Stunden profilieren sich die Milz und die Lunge diskret, ganz gering das Sternalmark, hier vorwiegend die enchondralen Knorpelzellen. Von der fluoreszierenden Imprägnation sind vollkommen ausgenommen die Gewebe des ZNS (Groß- und Kleinhirn) sowie mit Wahrscheinlichkeit die weißen Zellen des peripheren Blutbildes, insbesondere die Lymphozyten.

VI. Zusammenfassung

Aus den Versuchen können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die Testsubstanzen lassen sich in wässriger Lösung und bei Dosierung von 20 mg/kg in einer Konzentration gut so herstellen, daß die Injektionsmenge $1/100$ des Körpergewichts beträgt. Eine Ausnahme bildet 150/129, welches sich unter den obigen Bedingungen nur als Suspension herstellen läßt.
2. Die Testsubstanzen waren gut verträglich. Wenn man be-

denkt, daß die Tiere die Bolus-Injektion von 1/100 des Körpergewichts (entspricht 700 ml in die freie Bauchhöhle einer Normalperson) ohne sichtbare Schäden überstanden, dürfte dieses Verfahren innerhalb der therapeutischen Grenzen liegen. Alle Tiere überlebten. Auch histologisch waren keine Organschäden sicher feststellbar.

3. Das Aufbereitungsverfahren des histologischen Materials ist nicht abweichend von den sonst üblichen. Insbesondere die Formalinfixierung kann vertreten werden, da die formalininduzierte Fluoreszenz im wesentlichen (Ausnahme Tyramin-Gruppe und Tryptophan) eine Anregung außerhalb der 365 nm-Quecksilberlinie benötigt. Die unwesentliche Untergrundfluoreszenz durch das Aufziehen der Schnitte mit Eiweißglycerin (Eiweiße benötigen generell eine Anregung im 250 bis 280 nm-Bereich) kann als konstanter Fehler bei der Betrachtung von Organ- und Organellen-Anfärbung vernachlässigt werden.

4. Die pharmakologisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen 198 und 73 sind leichte Löslichkeit, Hydrophilie, schnelle Verteilung im Organismus nach den Gesetzen des Kreislaufs. Die histologischen Eigenschaften sind starke Markierung in den parenchymatösen Organen, welche eine wässrige Sekretion haben (Hirn-Plexus, Nierentubuli, Leber - Galle, Lungenbronchi, Parotisausführungsgänge, auch Uterus-Sekretionsphase) und eine spärliche Darstellung in nicht-sekretorischen Organen (Milz, Knochenmark, Cerebrum, Lungenparenchym). Auch die Organe mit hoher Energieleistung (Herz- und Skelettmuskel) stellen sich gut dar.

Die Eigenschaften der Substanzen 129 und 96 dagegen sind schwerere bis schwerste Löslichkeit und geringere Anfärbung. Diese geringere Anfärbung bezieht sich vor allem auf die parenchymatösen Organe und Sekretionsorgane. Im Prinzip ist das pharmakologische Geschehen der Anfärbung von Protein- und Nucleinsäure-Strukturen nicht grundverschieden von dem der anderen beiden Stoffe.

Die schwächere Anfärbung durch 129 und 96 kann auch darauf beruhen, daß die Emissionsoptima dieser Substanzen durch die hier verwendete Filterkombination des Fluoreszenzmikroskops nicht erreicht wurde.

Die Substanzen 198 und 73 sowie 129 und 96 kann man als Paare betrachten, da sie sich quantitativ und qualitativ sehr stark ähneln. Dabei geht die Kongruenz bis hin zu den Feinheiten der Darstellung der Herz- und Skelettmuskulatur in ihrer Querstreifung oder selektiven Darstellung oder Aussparung der Pankreasinseln.

Die Substanz 268/73 hat von den vier eingesetzten bei der angewandten Methode die stärkste färbende Potenz. Mit der beschriebenen fluoreszenzoptischen Anordnung ist sie also für den Histologen am interessantesten.

Die Kongruenz zwischen 129 und 96 ist nicht so weitreichend. Neben der verschiedenen Löslichkeit ist auch die geringere Fluoreszenzintensität hinderlich, um von Übereinstimmungen reden zu können. Festgehalten werden kann, daß die in die antileukämische Wirkung gesetzte Erwartung etwa einer bevorzugten Anreicherung im blutbildenden Gewebe (Knochenmark) und in Milz, Lymphknoten und unter Umständen im peripheren Blutbild nicht erfüllt wurde.

6. Unterschiede zwischen dem antileukämischen Substanzpaar 129 und 96 und dem trypanociden Substanzpaar, welches als Referenzsubstanz genommen wird, sind folgende:

a) 129 und 96 färben nicht oder kaum Lunge, Herz- und Skelettmuskel.

b) Substanz 96 ist positiv bei den Nierenglomeruli und negativ bei den Leberepithelien und den Pankreasinseln. 129 erscheint dagegen überhaupt nicht im Pankreas, schwach in den Leberepithelien.

c) Substanz 96 ist eindeutig positiv in den Milzfollikeln. Die granuläre Fluoreszenz ist bei 129 nur in der Niere vorhanden, nicht in den anderen Organen. Vergl. Tabelle auf der folgenden Seite.

	198/73		129/96	
Großhirn	-	-	-	-
Kleinhirn	-	-	(+)	-
Leberepithel	+	+	(+)	-
Nieren-Glomeruli	-	-	-	+
Pankreas	-	(+)	-	-
Inseln des Pankreas	+	+	-	-
Parotis Ausführungsgänge	+	+	(+)	-
Epithel	-	(+)	-	-
Lunge	+	+	-	-
Herzmuskel	+	+	-	-
Skelettmuskel	+	+	-	-
Milzfollikel	(+)	-	-	+
Knochenmark	(+)	+	-	?
Leukozyten im BB	(+)	+	-	-

Vereinfacht heißt das: Durch das antileukämische Stoffpaar ist eine granuläre cytoplasmatische Fluoreszenz nicht erzielbar. Die positive Kernanfärbung (im Gegensatz zu 198 und 73) ist vorhanden bei den Glomeruli und den weißen Milzfollikeln.

Aus diesen Befunden ist zu folgern, daß sich die antileukämischen Stoffe nicht im Cytoplasma und seinen Organellen (Mitochondrien, Ribosomen, Lysosomen) anreichern. Die Wirkung auf Eiweiß- und Energiestoffwechsel dürfte daher gering sein. Die Tatsache, daß die antileukämische Substanz 96 deutlich die weiße Milzpulpa färbt, könnte im Einklang stehen mit der Wirkung bei der experimentell induzierten lymphatischen/lymphozytoiden Leukämie. Diese Tatsache würde auf eine bevorzugte Anreicherung und Wirkung im Stoffwechsel der Nucleinsäuren hinweisen.

Die Erklärung für die fehlende cytoplasmatische Anreicherung des antileukämischen Substanzpaares könnte in der chemischen Struktur liegen.

7. Die Ausgangsfrage nach den Unterschieden in der Organverteilung zwischen antileukämischen und trypanociden Substanzen (Paaren) zerfällt in zwei Teile. a) Die Frage nach

Organunterschieden kann bejaht werden.^{b)} Die Frage, ob diese Organunterschiede beweisend oder zumindest plausibel für die verschiedene medikamentöse Wirkung der Substanzpaare sind, muß offen bleiben.

Der Unterschied zwischen antileukämischer und trypanocider Wirkung dokumentiert sich histologisch in der Organverteilung ohne durchgehende Bevorzugung der blutbildenden oder lymphatischen Organe, der Persistenz im Organismus und im Ausscheidungsverhalten.

G r o ß h i r n

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198	Ganglien							
	Glia			(+)				
	Gefäß-Bindegewebe				+ / Gran.			
268/73	Ganglien			einzel. Kern membr. / Gran				
	Glia	(+)			• (+)			
		Gran. Plex.		Gran. Bi. G.	Bindegew.			
150/129	Ganglien							
	Glia							
261/96	Ganglien							
	Glia							

K l e i n h i r n

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198	Ganglien Glia			(+) Gran.in Kern+Cyto				Gran.in Purkinje
268/73	Ganglien Glia	⚡ BG ++	(+)		(+) BG +	(+)		
150/129	Ganglien Glia		(+Körn.z.	(+)		(+) Purk. Körnerz.		
261/96	Ganglien Glia		(+Körn.z.			(+Körn. + Purk.z.		

L u n g e

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198	Interstit.-Z. Alveolar-Z. Bronch.-Z.		(+)	+	(+)	(+)	+	
						einz.Gran.		
268/73	Interstit.-Z. Alveolar-Z. Bronch.-Z.	++ (+)	++	++	+		(+) (+)	(+) (+)
				+	++	+ / Gran.	(+)Gran.	?
150/129	Interstit.-Z. Alveolar-Z. Bronch.-Z.		(bläulich)				Cyto(+)	(hell)
261/96	Interstit.-Z. Alveolar-Z. Bronch.-Z.							hell((+))

N i e r e

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198								
Glomerul.								
Tubul.	+++	++++	+++	++	++++	++++	+++ Gr. +++ Gr. ++ Gr.	
Rinde	+	++++	+++	+	+++	+++	+	
Mark/Papille	-	+	++	fleckig (+)	++	+	-	-
268/73								
Glomerul.								
Tubul.	++++	++++	++++	recti ++	++++	++++recti+++	++ recti	
Rinde	+++	++++	+++	+	+++	+++	+	+
Mark/Papille	++	+	++	(+)	+	+	-	-
Granula	-	-	++++	++	++++	++++	++	+
150/129								
Glomerul.								
Tubul.		(+)Gr	++ Gr	(+)Gr	++ Gr	(+)Gr	+	(+)
Rinde			+	(+)	++	(+)	+	
Mark/Papille			-	-	-	-	-	(+)
261/96								
Glomerul.								
Tubul.	+	(+)	(+)	-	(+)	-	((+))	(+)
Rinde		(+)	-	-	-	-	(+)	(+)
Mark/Papille	?	((+))	((+))	(+)	-	-	(+)	-
	+	+	(+)	-	+Sammel rohre	-	-	(+)

L e b e r

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198								
Epithel	+++	+++	+++	+	+	(+)	((+))	-
Kupffer-Z.	+++	++	++	+	+	+	+	(+)
Cytoplasm. Gran	++	Kern-Gr. Kern-Gr. Kern-Gr. Gr. Kern, Cyt (Cyto) Gr. Kupff.-						
268/73								
Epithel	+++	+++	+++	+++	++	(-)	-	-
Kupffer-Z.	++	++	++	++	+++	+++	++	(+)
Cytoplasm. Gran	+	-	-	+	++	(+)	-	(Gefäß BG)
150/129								
Epithel			(+)	((+))	((+))	-	-	-
Kupffer-Z.			(+)	(+)	-	((+))	(+)	((+))
Cytoplasm. Gran				Radspeich Kern-Gran				
261/96								
Epithel		-	-	-	-	-	-	-
Kupffer-Z.		((+))		((+))	(+)	-	-	(+)
Cytoplasm. Gran							((+))	

M i l z

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198 Milzfollikel								
Rote Pulpa				((+))	+	+	(+)	-
				-	(-)	-	-	-
						diss. Kern einz. K.		
268/73 Milzfollikel	((+))	?	-	-	+	-	-	-
Rote Pulpa	(+)	?	+	(+)	++	(+)	-	(+)
	Leukos ++ einz. Trab. Makro-		zellen +				Hilus-Z. ++ Makro-	zellen +
150/129 Milzfollikel								
Rote Pulpa							-	(+)
							((+))	-
261/96 Milzfollikel	+	?	(+)	(+)	(+)	-	+	+
Rote Pulpa	-	-	-	-	(+)	-	((+))	-
		diffus						
		fleckig						

H e r z m u s k e l

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198 Muskelzellen		+ K.membr. (+) Nucl.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+) K.m. fleckig fleckig	
(Bindegewebszellen)	(+)	++	+					
Cytoplasm.Gran.	Gran.Sp. u.RV		Gran.peri-Nucl. nucl.	Nucl. einz. Gran.	Nucl. Gran.++	Nucl. Gran.++	Nucl. Gran.+++	Nucl. Gran.++
268/73 Muskelzellen	(+)	+++	+ schattenh.schattenh.					
(Bindegewebszellen)	+	+	-	+	+	+	-	(+)
Cytoplasm.Gran.	(+)	{	+ (Li.Ven.)	+	+++	+	++	+
150/129 Muskelzellen			(Cyto(+))				(Cyto +) fleckig	
(Bindegewebszellen)								
Cytoplasm. Gran.			-			einz.Gr.		
261/96 Muskelzellen		(hell)	(Cyto +)		Kernmembr. (++)		Cyto ((+)) fleckig	
(Bindegewebszellen)								
Cytoplasm.Gran.								

S k e l e t t m u s k e l

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198	Muskelzellen (Bindegewebszellen) Cytoplasm. Gran.	einzelne Querstreif. ++ +++ (+)	(+)		schemenhaft schemenhaft schemenhaft schemenhaft			
268/73	Muskelzellen (fleckig) (Bindegewebszellen) Cytoplasm. Gran.	+ + +	+ Querstreif. +	+ +	(+)	+ +++ +	++ ++	(+) (+)
150/129	Muskelzellen (Bindegewebszellen) Cytoplasm. Gran.		extr. fleck.				(cyto +)	
261/96	Muskelzellen (Bindegewebszellen) Cytoplasm. Gran.		(Cyto +) schollig					

P a r o t i s

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198	Ausführungsgänge	+++	++++	++	+++	+++ (Gran.)	+++	++
	Epithel	(BG +)	-	-	(+)	+	+	-
	Granula	+	(+)	++	+++	+++	+++	++
268/73	Ausführungsgänge	++	+++	++	+++	+++	(+)	-
	Epithel	+	+	-	++	+	-	-
	Granula	-	+	+	+++	+++	(+)	
150/129	Ausführungsgänge	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-
	Epithel							
	Granula							
261/96	Ausführungsgänge						(+)	
	Epithel						fleckig	
	Granula							

P a n k r e a s

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198 Inselzellen	(+)	+	-	-	(+)	(+)	(+)	Gran
Parenchym	-	(+)	-	-	-	-	-	
			LK +++		Ausf.g.+ Ausf.g.+			
268/73 Inselzellen	+	++	++	+	+++	+	(Gran)-	-
Parenchym	(+)	(+)	+	(+)	-	(+)	-	-
Granula	diffus	+	(+)	(+)	+	+++	++	-
150/129 Inselzellen								
Parenchym								
Granula				(+)	LK ++	LK +		
261/96 Inselzellen								
Parenchym	(+)diff.		(+)streif.			((+))	fleckig	
Granula					LK +			

Knochenmark

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
102/198								
Knochenzellen					++	((+))	-	-
Knorpelzellen					+	(+)	+	((+))
Markraumzellen					+	+	(+)	(+)
					einz.gr.Z. große Z. Kernkon- tur einz. Nucl.			
268/73								
Knochenzellen					(+)	(+)	-	-
Knorpelzellen	(+)	(+)	-	-	++	++	+	-
Markraumzellen	+	+	+	(+)	+	+		((+))
	Megakar.z. Mega(++)		-	(+)	+	?	-	-
150/129								
Knochenzellen			-		((+))			
Knorpelzellen			(+)		((+))	((+))	-	
Markraumzellen							diff. blau	
261/96								
Knochenzellen	-	-	(+)	-	(+)			
Knorpelzellen	((+))		-	((+))	-			
Markraumzellen	-	(+)	+				((+))	(+)
							diff. blau	

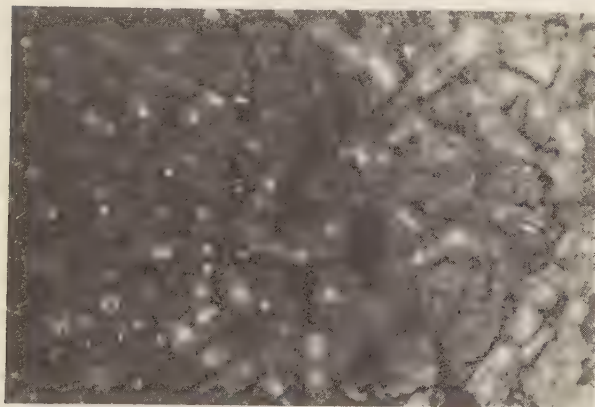
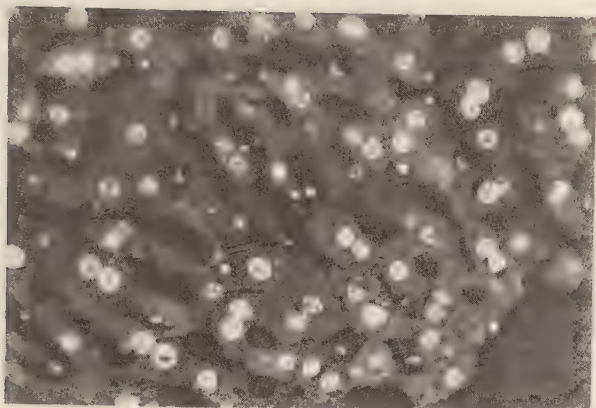


Abb. 1a + b: Fluoreszenz der Diamidine 102/198 (1a) und 150/129 (1b) in der Leber 4 Std. nach Applikation: Kernfluoreszenz und granuläre Cytoplasmafluoreszenz beider Substanzen, bei 102/198 deutlich stärker als bei 150/129.

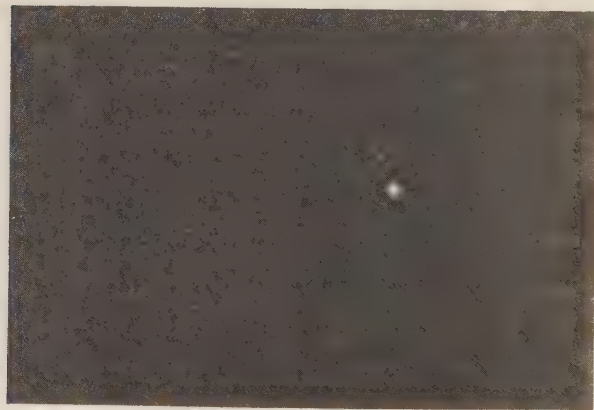
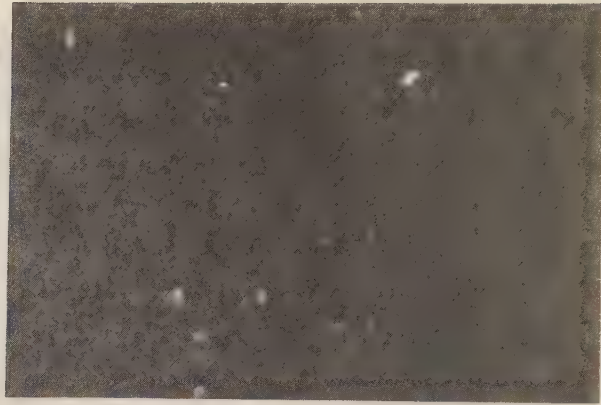


Abb. 2a + b: Fluoreszenz der Diamidine 102/198 (2a) und 150/129 (2b) in der Leber 2 Wochen nach Applikation: Nur noch schwache Kernfluoreszenz, bei 102/198 der Kerne der Epithelien und Sternzellen, bei 150/129 nur noch der Kerne der Sternzellen.

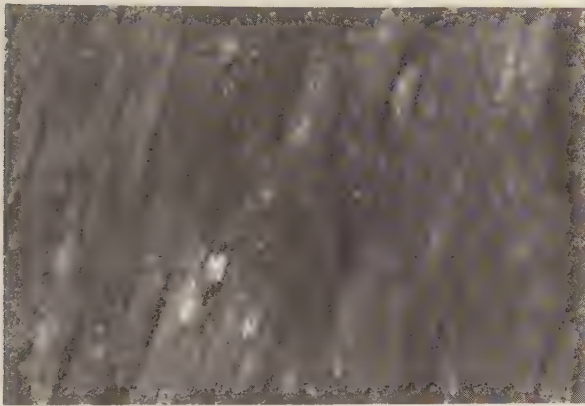
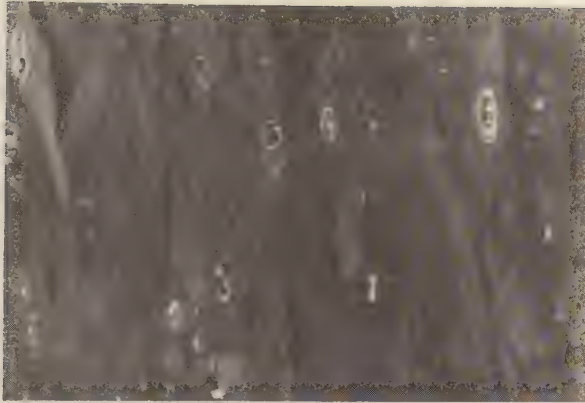


Abb. 3a + b: Fluoreszenz der Diamidine 102/198 (3a) und 268/73 (3b) im Herzmuskel 4 Tage nach Applikation: Kernfluoreszenz und granuläre Sarkoplasmafluoreszenz unterschiedlicher Intensität, bei 102/198 stärkere Kernfluoreszenz, bei 268/73 stärkere granuläre Sarkoplasmafluoreszenz.



Abb. 4a + b: Fluoreszenz der Diamidine 268/73 (4a) und 150/129 (4b) in der Niere 4 Std. nach Applikation: Kernfluoreszenz und granuläre Cytoplasmafluoreszenz beider Substanzen, bei 268/73 wesentlich intensiver als bei 150/129.

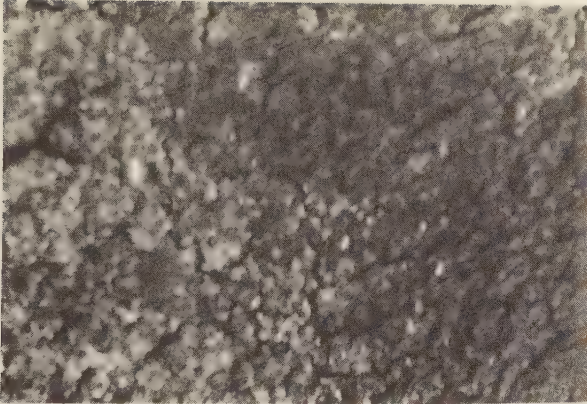


Abb. 5: Fluoreszenz der Diamidine 150/129 in der Milz 2 Wochen nach Applikation: Fluoreszenz der Zellen der weißen Milzpulpa und diffuse, angedeutet feingranuläre Untergrundfluoreszenz der weißen Milzpulpa; keine nennenswerte Fluoreszenz der roten Milzpulpa.



Abb. 6: Fluoreszenz der Diamidine 102/198 im Knochenmark 4 Std. nach Applikation: Starke Kernfluoreszenz von Blutbildungszellen, herdförmige, z.T. feingranuläre Untergrundfluoreszenz.

Literatur-Verzeichnis

- BARBER, H.J., R. SLACK und R. WIEN: Nature (London) 151, 107 (1943)
- DANN, O., E. HIEKE, H. HAHN, H.-H. MISERRE, G. LÜRDING, R. RÜSSLER:
Justus Liebig's Ann. Chem. 734, 23 (1970)
- FINK, E., O DANN: The specific curative and prophylactic activity of Diamidenes against T. Rhodesiense und T. Congolense (Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux in Les Moyens de Lutte contre les Trypanosomes et leurs Vecteurs. Actes du colloque, Paris 12-15, Mars 1974, Maison Alfort. pp 297-300)
- GROSSGEBAUER, K., M. KEGEL und O. DANN: Neues fluoreszenz-optisches Verfahren in der medizinisch-diagnostischen Mikrobiologie. DMW 29, 1098-1099 (1976)
- HAWKING, s. u. SCHNITZER
- HENRY, A.J.: Nature (London) 152, 690 (1943)
- JANSCO, N.v. u. H.v.JANSCO: Z.Immunitätsforschung Exper. Ther. 86, 1 (1935)
- KALIWODA, G.: Inaugural-Dissertation Erlangen (1976)
- PEARSE, A.G.E.: Histochemistry Theoretical and Applies, Churchill Livingstone, Edinburgh and London, Vol.II(1972)
- RUSSEL, W.C., C. NEWMAN, D.H. WILLIAMSON: A simple cyto-chemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature (London) 253, 461-462 (1975)
- SCHNEDL, W., A.-V. MIKELSAAR, M. BREITENBACH und O. DANN: Hum.Genet. Vol. 36, 167-172 (1977)
- SCHNITZER, R.J. u. HAWKING: Experimental Chemotherapie. Academic Press New York and London (1963)

Lebenslauf

Detlef Walter D a n n , geb. 22.6.39 in Hamburg

Erstes von drei Kindern der Eheleute Otto Dann, Chemiker und Apotheker, und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Wilken, Hausfrau.

1969 Heirat, 1971 Scheidung, keine Kinder

1945 - 49 Volksschule in Heidelberg

1949 - 51 Humanistisches Gymnasium in Heidelberg

1951 - 58 Humanistisches Gymnasium in Erlangen, Abitur

1958 - 63 Studium der Psychologie in Bern und Heidelberg,
Diplomexamen

1963 - 69 Studium der Humanmedizin in Würzburg, Erlangen
und Heidelberg, Staatsexamen

1969 - 70 Medizinalassistenten-Zeit in Calw, Bruchsal und
Heidelberg

1971 - 76 Chirurgische Assistenzzeit in Wöhlershof/Opf.,
Bad Mergentheim, Roth bei Nürnberg, Theresien-
krankenhaus Nürnberg, Aalen

1.12.76 Wissenschaftliche Hilfskraft am Pathologischen
Institut Erlangen (Leiter: Prof. Dr. V. Becker)
und Doktorand

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990